

INSULIN-LIKE PEPTIDE

Patent Number: JP2000191697
Publication date: 2000-07-11
Inventor(s): TAKUWA KYOKO; ISHIGURO MASAJI; NAKAJIMA TERUMI
Applicant(s): SUNTORY LTD
Requested Patent: ☐ JP2000191697
Application Number: JP19980373868 19981228
Priority Number(s):
IPC Classification: C07K14/625; C07K14/435; C12N15/09
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a peptide useful for developing a reagent for studies of metabolic regulation, cell proliferation, differentiation, aging, etc., and a medicine, etc., by selecting the peptide from among an insulin-like peptide-1 etc., derived from *Caenorhabditis elegans*, etc.

SOLUTION: This peptide is selected from the group consisting of a insulin- like peptide-1 and an insulin-like peptide-2 derived from *Caenorhabditis elegans*. Preferably a host cell such as *Escherichia coli* transformed with a vector containing a polynucleotide having a nucleic acid sequence selected from the group consisting of a gene encoding the peptide and DNAs each encoding an amino acid sequence of formula I to formula IV is cultured in a medium to produce the peptide. Preferably, the insulin-like peptide is subjected to an interaction with an insulin receptor to carry out a binding assay.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-191697

(P2000-191697A)

(43)公開日 平成12年7月11日(2000.7.11)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	FI	テマコード*(参考)
C07K 14/625		C07K 14/625	4B024
14/435		14/435	4H045
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNAA
// (C12N 15/09	ZNA		
C12R 1:91)			

審査請求 未請求 請求項の数3 OL (全 12 頁)

(21)出願番号 特願平10-373868

(22)出願日 平成10年12月28日(1998.12.28)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成10年10月7日～
10月9日 日本ペプチド学会主催の「第35回ペプチド討
論会」において文書をもって発表

(71)出願人 000001904

サントリー株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

(72)発明者 宅和 京子

大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号

サントリー株式会社研究センター内

(72)発明者 石黒 正路

大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号

サントリー株式会社研究センター内

(74)代理人 100089705

弁理士 社本 一夫 (外5名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 インスリン様ペプチド

(57)【要約】

【課題】 新たなインスリン様ペプチドの提供。

【解決手段】 カイコガのインスリン様ペプチドのポン
ビキシンA鎖の配列を基に、*C. elegans*のゲノムプロジ
ェクト情報を検索し、相同性の高い配列を2種類見い出
した。次に、その配列を基に*C. elegans*のmRNAに対して
5'/3'RACEを行い、インスリン様ペプチド前駆体をコー
ドするcDNAを単離した。cDNAの塩基配列からアミノ酸配
列を推測し、これらの前駆体が、シグナルペプチド、B
鎖、C-ペプチド、A鎖の順に構成されていることを明ら
かにした。さらに、インスリン様ペプチドの配列を特定
して高次構造のモデリングを行い、哺乳動物のインスリ
ン関連ペプチドの高次構造と比較検討した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ケノルハブディティス エレガンズ(*Caenorhabditis elegans*)由来のインスリン様ペプチド-1又はインスリン様ペプチド-2からなる群より選ばれたペプチド。

【請求項2】 請求項1のペプチドをコードする遺伝子

【請求項3】 配列番号1、6、9および11のアミノ酸配列を各々コードするDNAからなる群から選ばれた核酸配列を持つポリヌクレオチド

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、代謝調節、細胞増殖・分化、さらには老化などの研究用の試薬、あるいは医薬品等の開発に寄与すると考えられるインスリン様ペプチド前駆体及びインスリン様ペプチド、ならびに当該物質をコードする遺伝子に関する。

【0002】

【従来技術】哺乳動物のインスリン関連ペプチドは、代謝調節、細胞の増殖および分化を制御する重要なホルモンである。一方、昆虫・軟体動物・脊索動物などの無脊椎動物からもヒトインスリン（以後、インスリンという）と構造が類似するペプチド（以後、インスリン様ペプチドという）が単離されているが、それらの生理作用は殆ど解明されていない。ところで、最近、線虫(*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*))からインスリン受容体相同遺伝子*daf-2*がクローニングされた。*C. elegans*は1齢、2齢幼虫のときに外部環境が悪化すると、これを神経系を介して感知し、飢餓、高温、高密度及びその他のストレスに耐性をもった耐性幼虫に変化する。通常の状態で餌を摂らない場合の寿命は約3週間であるのに対し、この耐性幼虫は餌を摂らずに数ヶ月間生き延びることができ、その間に環境が回復すれば成虫へと生育を再開する。*DAF-2*インスリン受容体経路は、この耐性幼虫形成を制御していることが明らかになった。これらのことは、*DAF-2*インスリン受容体経路が関与すると考えられる現象、例えばエネルギー代謝、形態変化、寿命の延長などが、インスリン様ペプチドによって制御されている可能性を示す。なお、*C. elegans*ゲノムの全DNA塩基配列は、*C. elegans*ゲノムプロジェクトによって解析されているという情報がある(Stephen A. Chervitz, et al., Comparison of the Complete Protein Sets of Worm and Yeast: Orthology and Divergence, (1998) Science 282, 2022-2027)。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ケノルハブディティス エレガンズ(*Caenorhabditis elegans*)由来のインスリン様ペプチド-1又はインスリン様ペプチド-2からなる群より選ばれたペプチドを提供する。

【0004】本発明は、上記インスリン様ペプチド-1

又はインスリン様ペプチド-2のペプチドをコードする遺伝子も提供する。

【0005】本発明は、さらに、各々がインスリン族ペプチドのA鎖及びB鎖を含む上記インスリン様ペプチド-1又はインスリン様ペプチド-2の各A鎖及びB鎖に係るアミノ酸配列を各々コードするDNAからなる群から選ばれた核酸配列を持つポリヌクレオチドも提供する。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、*DAF-2*インスリン受容体のリガンドと考えられるインスリン様ペプチドを同定しようと試みた。

【0007】*C. elegans*の生体機能は、哺乳動物のインスリン・IGF経路の関与する生体機能と類似点が多いという観点から、*C. elegans*が、動物界に広く存在するインスリン情報伝達経路を研究する上でのモデルとなり得ると考えられる。そこで、カイコガのインスリン族ペプチドのボンビキシンIIのA鎖の配列を基に、*C. elegans*のゲノムプロジェクト情報(Wilson, R. et al., (1994) 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*, Nature 368: 32-38)を検索することで、上記ボンビキシンIIのA鎖の配列に相同性の高い配列を見出し、さらに、*C. elegans* mRNAより5'/3' RACE法(Loh, Y. et al., (1989) Science 243, 217; Ohara et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5073; Frohmann, M., (1994) PCR Methods and Applications, 4, 540-558)を用いて、インスリン様ペプチド前駆体をコードする遺伝子を単離した。また、当該遺伝子の配列からインスリン様ペプチドの前駆体およびインスリン様ペプチドの配列を特定し、さらにコンピュータモデリングにより、当該ペプチドの立体構造を推定した。

【0008】本発明に係る*C. elegans*由来のインスリン様ペプチド-1およびインスリン様ペプチド-2ならびに当該ペプチドの前駆体、さらに当該ペプチドをコードする遺伝子は、*C. elegans*を材料として、以下の方法により構造を特定した。まず、カイコガのインスリン族ペプチドのボンビキシンIIのA鎖の配列を基に、前述の*C. elegans*のゲノムプロジェクト情報を検索した。次に、上記ボンビキシンA鎖の配列と相同性の高い2種類の配列について、インスリン様ペプチド前駆体をコードする遺伝子を特定した。この検索は、相同性に関しては、インスリン関連ペプチド間で極めてよく保存され、立体構造に重要であるシステイン残基に特に注目して行った。特定した各配列に対して特異的なオリゴプライマーを合成した。さらに、*C. elegans*よりtotal mRNAを調製後、1本鎖cDNAを合成し、それを鋳型にして前述のオリゴプライマーを用いて5'/3' RACEを行い、2種類の配列のおのおのについて全長cDNAを単離した。さらに、単離したcDNAの塩基配列をゲノムDNAと比較解析し、それぞれの遺伝子

構造(塩基配列)を明らかにした。また、当該塩基配列から特定されるアミノ酸配列より、2種類のインスリン様ペプチド前駆体配列を明らかにし、これらの前駆体が、シグナルペプチド、B鎖、C-ペプチド、A鎖の順に構成されていることを明らかにした。それを基に2種類のインスリン様ペプチド(インスリン様ペプチド-1およびインスリン様ペプチド-2とする)の配列を特定した。さらに、コンピュータモデリングにより、インスリン様ペプチド-1およびインスリン様ペプチド-2の立体構造を推測した。

【0009】本発明により特定されたインスリン様ペプチド-1のペプチド前駆体及び遺伝子は、配列番号1に示されている。配列番号1中：シグナルペプチドは、1番目のMet～23番目のLeuであり、B鎖は、24番目のGln～50番目のMetであり、C-ペプチドは、51番目のArg～72番目のArgであり、A鎖は、73番目のGln～95番目のThrである。

【0010】なお、33番目と79番目のCys間、48番目と92番目のCys間及び78番目と83番目のCysの間にはS-S結合を生じて、図1-Aに示す高次構造をとることが可能である。また、C-ペプチド中の最初の2つのArg及び最後のArgは、タンパク分解酵素による切断部位である。

【0011】インスリン様ペプチド-2のペプチド前駆体及び遺伝子は、配列番号2に示されている。配列番号2中：シグナルペプチドは、1番目のMet～23番目のArgであり、B鎖は、24番目のAla～51番目のMetであり、C-ペプチドは、52番目のArg～72番目のArgであり、A鎖は、73番目のThr～95番目のGlyである。

【0012】なお、34番目と78番目のCys間、49番目と91番目のCys間及び77番目と82番目のCys間にはS-S結合を生じて、図1-Bに示す高次構造をとることが可能である。また、C-ペプチド中の最初の2つのArg及び最後のArgは、タンパク分解酵素による切断部位である。

【0013】本発明のペプチドの上記構造は、当該ペプチドをコードする遺伝子構造、当該ペプチドの前駆体構造および当該ペプチドの立体構造において、哺乳動物由来のインスリン関連ペプチドと類似している。

【0014】本発明のペプチドは、化学合成法あるいは遺伝子組換え法の常法で得ることができる。

【0015】遺伝子組換え法で製造する場合、宿主としては、原核生物又は真核生物を用いることができる。原核生物としては、細菌、例えばエシェリヒア(*Escherichia*)属に属する細菌、例えば大腸菌(*Escherichia coli*)、バシラス(*Bacillus*)属細菌、例えばバシラス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)、等常用の宿主を用いることができる。

【0016】真核性宿主としては、下等真核生物、例え

ば真核性微生物、例えば真菌である酵母又は糸状菌が使用できる。酵母としては、例えばサッカロミセス(*Saccharomyces*)属微生物、例えばサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)等が挙げられ、また糸状菌としてはアスペルギルス(*Aspergillus*)属微生物、例えばアスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニカー(*Aspergillus niger*)、ペニシリウム(*Penicillium*)属微生物等が挙げられる。さらに、動物細胞又は植物細胞が使用でき、動物細胞としては、マウス、ハムスター、サル、ヒト等の細胞系が使用される。さらに、昆虫細胞、例えばカイコの細胞、又はカイコの成虫それ自体も宿主として使用される。

【0017】宿主の形質転換に用いる発現ベクターは、本発明ペプチドをコードする遺伝子に加え、導入すべき宿主の種類に依存して発現制御領域、例えばプロモーター及びクローニングサイト、複製起点等を含有する。細菌用発現ベクターのプロモーターとしては、常用のプロモーター、例えばlacプロモーター、tacプロモーター、 λ プロモーター等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えばグリセロールデヒドロキシリン酸デヒドロゲナーゼプロモーター、PHO5プロモーター等が使用され、糸状菌用プロモーターとしては例えばアミラーゼ、trpL等が使用される。また、動物細胞宿主用プロモーターとしてはウイルス性プロモーター、例えばSV40アタチングプロモーター、SV40レイトプロモーター等が使用される。

【0018】発現ベクターの作製は、制限酵素、リガーゼ等を用いて常法に従って行うことができる。また、発現ベクターによる宿主の形質転換も、常法に従って行うことができる。

【0019】本発明ペプチドの製造においては、前記の発現ベクターにより形質転換された宿主を培養、栽培または飼育し、培養物等から常法に従って、例えば、濾過、遠心、細胞の破碎、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等により目的とするペプチドを回収、精製することができる。

【0020】本発明のインスリン様ペプチドについて、活性を確認するためには、培養細胞中で発現させた*C. elegans*のインスリン受容体あるいは哺乳動物の受容体と相互作用させることからなるバインディングアッセイ(Tung Ming Fong et al., The role of histidine 265 in antagonist binding to the neurokinin-1 receptor, (1994) J.B.C., 269: 2728-2732)を用いることができる。

【0021】本発明のペプチドは、当該ペプチドをコードする遺伝子配列、当該ペプチドの前駆体構造および当該ペプチドの立体構造において、哺乳動物由来のインスリン関連ペプチドと類似していることから、インスリン様活性を有することが十分に期待できる。さらに、本ペプチドの受容体の可能性が高いDAF-2インスリン受容体が、エネルギー代謝、形態変化、長寿および老化に関与

っているという報告 (Kimura, K.D., et al. (1997) *daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans**, Science 277: 942-946, 木村幸太郎, Ruvkun G.: 細胞工学 (1998) 17: 768-770, 木村幸太郎, 本田修二: 細胞工学 (1998) 19: 1393-1998) があることから、本発明のペプチドは、それらの研究用の試薬としてだけでなく、哺乳動物において代謝、老化に関する医薬品等の開発に寄与するものである。

【0022】本発明は更にインスリン様ペプチド-1およびインスリン様ペプチド-2以外の *C. elegans* 由来のインスリン用ペプチドを見つけるためのプローブに関する。具体的には配列番号4, 6, 9および11に係るアミノ酸配列を各々コードするDNAからなる群から選ばれた核酸配列を持つポリヌクレオチドを、インスリン様ペプチド-1およびインスリン様ペプチド-2以外の *C. elegans* 由来のインスリン様ペプチドを見つけるためのプローブとして使用できる。すなわち、前述の *C. elegans* のゲノムプロジェクト情報から配列番号1, 6, 9及び11のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドに対して、例えば以下に示す (SSC) 条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを見つけることにより、インスリン様ペプチド-1又はインスリン様ペプチド-2のアミノ酸配列に対し、高い相同性、例えば80%以上、好ましくは90%以上の相

ins1-GSP-1: TCAGGTGGTTCAACATTAC
ins1-GSP-2: TCATGTCTGTGTCGATGCG
ins1-GSP-3: CAGTAGGCAAGAAGATCTC
ins1-GSP-4: AGATCTTCACGTTGCAACC
ins2-GSP-1: GAATATGTGCTGTGAGACGG
ins2-GSP-2: GGATGTGAATTCACCTGACATT
ins2-GSP-3: TTATCCAAAGGATTGCAGATTG
ins2-GSP-4: AATGTCACTGAATTCACATCC
SL1 primer: GGTTTAATACCAAGTTTGGAG

【0026】次に、以下の手順で *C. elegans* total RNAを調製した。液体培養で増やした *C. elegans* 約1gを液体窒素中で粉砕し、10 mlのTRIzol (TM) 試薬 (GIBCO BRL社) 中でホモシナイズした。2 mlのクロロホルムを加えて撹拌後、冷却遠心機 (株) 佐久間製作所) で遠心分離 (13,000 rpm, 15分間, 4℃) した。上層の水層を分取して5 mlのイソプロパノールを加え、室温で10分静置した。冷却遠心機で遠心分離 (13,000 rpm, 10分間, 4℃) した後、上清を除いて10 mlの75%エタノールを加えて再度遠心分離 (10,000 rpm, 5分間, 4℃) した。上清を除いて10分間ほど風乾し、100 µlのRNase-free水を加え、60℃で10分間インキュベートしてRNAを溶解した。以上の方法で約1mgのtotal RNAが得られた。

【0027】次に、5'/3' RACE Kit (Boehringer Mannheim社) を用いて以下の手順で3'RACEを行った。1 µgのto

同性的アミノ酸配列を有する新規のインスリン様ペプチドをコードするポリヌクレオチドを得ることができる。これら新規のインスリン様ペプチドは前述と同様に化学合成法あるいは遺伝子組換え法の常法で得ることができ、さらに、A鎖とB鎖を組み合わせを変えることで、多くの新規のペプチドを得ることができる。得られたペプチドについて、培養細胞中で発現させた *C. elegans* のインスリン受容体あるいは哺乳動物の受容体と相互作用させることからなる上述のバインディングアッセイによって活性を知ることができる。

【0028】

【実施例】a. 相同遺伝子の検索

カイコガのインスリン様ペプチドのポンベキシジンA鎖の配列 (配列番号7) を基に、GENETYX-MAC/DB (ソフトウェア (株)) を使用して、データベースのホモロジー検索を行った。その結果、*C. elegans* 由来の遺伝子の中から、A鎖の4つのシステイン残基が完全に保存されている配列を2種類見出した。さらにデータベースの情報詳細に解析し、それらの2種類の遺伝子にはB鎖の2つのシステイン残基も保存されていることを確認した。

【0024】b. 各cDNAのクローニング

予想されるcDNAの配列を基に、特異的なオリゴプライマーを設計して化学合成した。化学合成したプライマーの配列を以下に示す。

【0025】

(配列番号12)

(配列番号13)

(配列番号14)

(配列番号15)

(配列番号16)

(配列番号17)

(配列番号18)

(配列番号19)

(配列番号20)

tal RNA, cDNA synthesis buffer, dNTP mix, oligod(T)-anchor primer, AMV reverse transcriptase, DEPC-treated waterを混合し、55℃で60分間インキュベートして1本鎖cDNA (1st-strand cDNA) を合成した。続いて以下の条件で1st-PCRを行った。1st-strand cDNA, PCR buffer, dNTPmix, PCR anchor primer, ins1-GSP-1あるいはins2-GSP-1, TaKaRa Ex Taq (TM) (宝酒造 (株))、精製水を混合し、94℃5分の後、94℃30秒、55℃30秒、72℃2分で30サイクル、72℃でさらに5分反応させた。PCRには、GeneAmp PCR System 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer社) を用いた。続いて、1st-PCR産物を鋳型にし、プライマーとしてins1-GSP-2とPCR anchor primerあるいはins2-GSP-2とPCR anchor primerの組み合わせで、1st-PCRと同じ条件でnested-PCRを行った。各遺伝子の1st-PCR産物、nested-PCR産物を1.5%アガロースゲルで電気泳動したところ、イ

ンスリン様ペプチド-1およびインスリン様ペプチド-2のいずれにおいても約250bpのバンドが確認できた。

【0028】次に、*C. elegans*に特徴的なtrans-splicing leader (SL) 配列 (Krause, M. (1995) in *Caenorhabditis elegans: Modern Biological Analysis of an Organism* (Epstein, H and Shakes, D.C., Eds.), Vol. 48, pp. 494-499, Academic Press, San Diego.) を利用して、以下の条件で5'RACEを行った。1st-strand (DN A, PCR buffer, dNTPmix, SL1 primer, ins1-GSP-3あるいはins2-GSP-3, TaKaRaEx Taq (TM) (宝酒造 (株)), 精製水を混合し、94℃5分、94℃30秒、55℃30秒、72℃2分で30サイクル、72℃でさらに5分反応させた。続いて、1st-PCR産物を鋳型にし、プライマーとしてSL1primerとins1-GSP-4あるいはSL1primerとins2-GSP-4の組み合わせで、1st-PCRと同じ条件でnested-PCRを行った。各遺伝子の1st-PCR産物、nested-PCR産物を1.5%アガロースゲルで電気泳動したところ、インスリン様ペプチド-1およびインスリン様ペプチド-2いずれにおいても約350bpのバンドが確認できた。

【0029】次に、各PCR産物をTAクローニングベクターpCR2.1 (Invitrogene社) に挿入し、組換え体を大肠菌JM109に形質転換してLB (50mg/mlアンピシリンを含む) 寒天培地上で培養した。得られたコロニーを鋳型に、M13ユニバーサルプライマーを用いてcolony PCRを行った。PCR条件は、90℃10分、94℃30秒、55℃30秒、72℃1分で30サイクル、72℃でさらに5分とした。1.5%アガロースゲルで電気泳動後、目的のcolony PCR産物をスピンカラム (MicroSpin (TM) S-400, Amersham Pharmacia社) で精製し、DNA Sequencing Kit (Applied Biosystems社) を用いて直接シーケンスを行った。シーケンスには、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems社) を用いた。

【0030】得られた配列を、遺伝子解析ソフトGENETY

X-MAU (ソフトウェア開発(株)) を用いて解析し、インスリン様ペプチド-1の全長cDNA配列 (遺伝子配列) (配列番号1) およびインスリン様ペプチド-2の全長cDNA配列 (配列番号2) を明らかにして、各々の遺伝子がコードするインスリン様ペプチドの前駆体のアミノ酸配列 (配列番号1、2) を特定した。

【0031】c. インスリン様ペプチドのA鎖およびB鎖の構造の特定

特定されたインスリン様ペプチド前駆体のアミノ酸配列から、これらの前駆体がシグナルペプチド (配列番号3、8)、B鎖 (配列番号4、9)、C-ペプチド (配列番号5、10)、A鎖 (配列番号6、11) の順に構成されていることを明らかにし、インスリン様ペプチド-1のA鎖の配列 (配列番号6) およびB鎖の配列 (配列番号4) ならびにインスリン様ペプチド-2のA鎖の配列 (配列番号11) およびB鎖のアミノ酸配列 (配列番号9) を特定した。これらのペプチドのアミノ酸配列はヒトインスリンのアミノ酸配列、ブタインスリンのアミノ酸配列またはヒトリラキシン-2のアミノ酸配列といった哺乳動物由来のインスリン関連ペプチドのアミノ酸配列と高い相同性がある (表1)。したがって、これらのインスリン様ペプチドはインスリン様活性を有することが十分に期待される。なお、インスリン様ペプチド-1のB鎖の配列の11位から13位、およびインスリン様ペプチド-2のB鎖10位から12位にはPro-Pro-Glyの配列があるが、この配列は哺乳類のインスリン関連ペプチドのB鎖にはない特徴的なものである。なお、当該ペプチドは常法により化学合成又は遺伝子組換え法により得ることができる。また、得られたインスリン様ペプチドについて、培養細胞中で発現させた*C. elegans*のインスリン受容体あるいは哺乳動物の受容体と相互作用させることからなる上述のハインディングアッセイによって活性を知ることができる。

【0032】

【表1】

Amino acid sequences of insulin-superfamily peptides

	B-chain	A-chain
Ceinsulin-1	QQADGRMKMCPGGSTETMAWSMSCSM	QLQTICCCQVGCNVEDLLAYCAPI
Ceinsulin-2	AKHGSCLKCPGGGASFLDAFNLICPM	TNMCCETGCEFTDIFAICNPFG
Bombyxin II	QQPQAVHTYC---GRHLARTLADLCWEAGVD	GIVDECCCLRPCSVVDVLLSYC
Bombyxin IV	QEANVAHHYC---GRHLANTLADLCWDTSE	GVVDECCIQPCTLDVLATYC
LIRP	SGAPQPVARYC---GEKLSNALKLVCRVNYNTMF	TRGVDECCCKTCSISELQTYCG
human insulin	FVNQHLC---GSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT	GIVEQCCTSI CSLYQLENYCN
porcine insulin	FVNQHLC---GSHLVEALYLVCGERGFFYTPKA	GIVEQCCTSI CSLYQLENYCN
human IGF-I	GPETLC---GAELVDALQFVCGDGRGFFYFNKPT	QTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA
porcine IGF-I	GPETLC---GAELVDALQFVCGDGRGFFYFNKPT	QTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPATKSA
human IGF-II	AYRPSSETLC---GGELVDTLQFVCGDGRGFFYFSRPA	RSIVVECCFRSCDLALLETYCATPAKSE
human relaxin-1	KWKDDVIKLC---GRELVRAQIAICGMSTWS	RPYVALFEKCCCLIGCTKRSIAKYC
human relaxin-2	DSWMEEVIKLC---GRELVRAQIAICGMSTWS	QLYSALANKCCHVGCTKRSIARFC
porcine relaxin	QSTNDFIKAC---GRELVRLWVEICGVWS	RMTLSEKCCCEVGCIRKDIARLC

【0033】d. インスリン様ペプチドの立体構造の特定さらに、以下の手順でコンピュータモデリングを行い、ジスルフィド結合の位置および高次構造を推定した。ヒトインスリンと極めて高い相関性を持つブタインスリンの結晶構造 (Brookhaven Protein Data Bank, accession number 9INS) のデータを基に、インスリン様ペプチド-1およびインスリン様ペプチド-2の予備的な高次構造を作り出し、ヘリックスのN末端にPro-Pro-Gly部分を挿入し、両鎖のN末端とC末端部分を付け加えた。その構造に対して、Indigo 2 workstation (シリコングラフィックス社) 上でモデリングソフトDiscover-3 (Molec-

ular Simulations社)を用いてエネルギー最適化を行ってInsight-2 (Molecular Simulations社)で表わしたところ、得られたインスリン様ペプチド-1の立体構造 (図1-A) およびインスリン様ペプチド-2の立体構造 (図1-B) は、ブタインスリン (図1-C) やヒトリラキシン-2 (accession number 6RLX) (図1-D) の高次構造と類似していた。したがって、インスリン様ペプチド-1及びインスリン様ペプチド-2はインスリン様活性を有することが十分に期待される。

【0034】

【発明の効果】本発明により、*C. elegans*由来の新規の

インスリン様ペプチド、インスリン様ペプチド前駆体、当該物質をコードする遺伝子ならびに当該ペプチドのA鎖およびB鎖をコードするポリヌクレオチドが明らかになった。これらは、代謝調節、細胞増殖・分化、さらに

は老化などの研究用の試薬、あるいは医薬品等の開発に寄与するものである。

【0035】

【配列表】

```

<;110>; サントリー株式会社
<;120>; インスリン様ペプチド
<;130>; 982351
<;141>; 1998-12-28
<;160>; 20
<;210>; 1
<;211>; 440
<;212>; DNA
<;213>; Caenorhabditis elegans
<;220>;
<;223>; インスリン様ペプチド-1前駆体の塩基配列およびアミノ酸配列
<;400>; 1
attgctegaa agctccgcc cacattttgc cttggcgctc ccactattcc aaaataaagc 60
tcattttaat ttaacaca atg gtc cac cga ctt ttc atc gtc ctt att gca 111
Met Val His Arg Leu Phe Ile Val Leu Ile Ala
5 10
att att ctt gtc gca aaa tca act gca atc tca ctt caa caa gct gac 159
Ile Ile Leu Val Ala Lys Ser Thr Ala Ile Ser Leu Gln Gln Ala Asp
15 20 25
gga cgc atg aaa atg tgc cca cca ggt ggt tca aca ttc aca atg gca 207
Gly Arg Met Lys Met Cys Pro Pro Gly Gly Ser Thr Phe Thr Met Ala
30 35 40
tgg tca atg tgc tgt tgc atg cgc agg aga aaa cga gat gtt gga cga 255
Trp Ser Met Ser Cys Ser Met Arg Arg Arg Lys Arg Asp Val Gly Arg
45 50 55
tat ttc gaa aaa cgt gct ctg atc gcc cca tca atc cgt caa ctt caa 303
Tyr Phe glu Lys Arg Ala Leu Ile Ala Pro Ser Ile Arg Gln Leu Gln
60 65 70 75
aca att tgc tgt caa gtt ggt tgc aac gtg gaa gat ctt ctt gcc tac 351
Thr Ile Cys Cys Gln Val Gly Cys Asn Val Glu Asp Leu Leu Ala Tyr
80 85 90
tgt gcc cca att taa gtaccgccca caaaatacgc atcagttttt tcccgcctc c 407
Cys ala Pro Ile
95
gtcgaaatgaa tatcacatcc ctgttaaaaa aaa 440
<;210>; 2
<;211>; 570
<;212>; DNA
<;213>; Caenorhabditis elegans
<;223>; インスリン様ペプチド-2前駆体の塩基配列およびアミノ酸配列
<;400>; 2
aatcggttac tcgtttctcg cgtttggcat aagcgagtat ctgtgateca aatgtttctg 60
accagagggg tactcttttt actgtctttg atg gct gct gta gcc gca ttc ggg 114
Met Ala Ala Val Ala Ala Phe Gly
5
ctg ttt tct aga cgc gct cca atc act cgg gac act atc cga cca cca 162

```


Leu Phe Ser Arg Pro Ala Pro Ile Thr Arg Asp Thr Ile Arg Pro Pro
 10 15 20
 cgt gcc aaa cac ggt teg ctg aaa tta tgc cca cca ggt ggt gcc tca 210
 Arg Ala Lys His Gly Ser Leu Lys Leu Cys Pro Pro Gly Gly Ala Ser
 25 30 35 40
 ttc ctt gac gct ttc aac ttg att tgc cca atg cgc cgt cga cgc agg 258
 Phe Leu Asp Ala Phe Asn Leu Ile Cys Pro Met Arg Arg Arg Arg Arg
 45 50 55
 agt gtt tca gaa aac tac aac gac ggc ggt ggc agc ctt ttg gga cgg 306
 Ser Val Ser Glu Asn Tyr Asn Asp Gly Gly Gly Ser Leu Leu Gly Arg
 60 65 70
 aca atg aat atg tgc tgt gag acg gga tgt gaa ttc act gac att ttc 354
 Thr Met Asn Met Cys Cys Glu Thr Gly Cys Glu Phe Thr Asp Ile Phe
 75 80 85
 gca atc tgc aat cct ttt gga taa aaacagateta cttaccctc getttactgg 408
 Ala Ile Cys Asn Pro Phe Gly
 90 95
 aactccaaat aaaacaattt tataattctt ttctctgaat ctccacat cttgttctac 468
 cgtggccag cttgacactc tcaatcccat ccgtatgtc cacaccaac atgettgtg 528
 gglttagatc tcaataatat ttctttaaca aaaaaaaaaa aa 570

<210>: 3

<211>: 23

<212>: PRT

<213>: Caenorhabditis elegans

<223>: インスリン様ペプチド-1のシグナルペプチド

<400>: 3

Met Val His Arg Leu Phe Ile Val Leu Ile Ala Ile Ile Leu Val Ala

5

10

15

Lys Ser Thr Ala Ile Ser Leu

20

<210>: 4

<211>: 27

<212>: PRT

<213>: Caenorhabditis elegans

<223>: インスリン様ペプチド-1のB鎖のアミノ酸配列

<400>: 4

Gln Gln Ala Asp Gly Arg Met Lys Met Cys Pro Pro Gly Gly Ser Thr

5

10

15

Phe Thr Met Ala Trp Ser Met Ser Cys Ser Met

20

25

<210>: 5

<211>: 22

<212>: PRT

<213>: Caenorhabditis elegans

<223>: インスリン様ペプチド-1のC-ペプチドのアミノ酸配列

<400>: 5

Arg Arg Arg Lys Arg Asp Val Gly Arg Tyr Phe Glu Lys Arg Ala Leu

5

10

15

Ile Ala Pro Ser Ile Arg

20

<210>: 6

<211>: 23

<212>: PRT

<213>: *Caenorhabditis elegans*

<228>: インスリン様ペプチド-1のA鎖のアミノ酸配列

<400>: 6

Gln Leu Gln Thr Ile Cys Cys Gln Val Gly Cys Asn Val Glu Asp Leu
5 10 15
Leu Ala Tyr Cys Ala Pro Ile
20

<210>: 7

<211>: 20

<212>: PRT

<213>: カイコガ

<228>: ホンビキシンIIのA鎖のアミノ酸配列

<400>: 7

Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Leu Arg Pro Cys Ser Val Asp Val Leu
1 5 10 15
Leu Ser Tyr Cys
20

<210>: 8

<211>: 25

<212>: PRT

<213>: *Caenorhabditis elegans*

<228>: インスリン様ペプチド-2のシグナルペプチド

<400>: 8

Met Ala Ala Val Ala Ala Phe Gly Leu Phe Ser Arg Pro Ala Pro Ile
5 10 15
Thr Arg Asp Thr Ile Arg Pro Pro Arg
20 25

<210>: 9

<211>: 26

<212>: PRT

<213>: *Caenorhabditis elegans*

<228>: インスリン様ペプチド-2のB鎖のアミノ酸配列

<400>: 9

Ala Lys His Gly Ser Leu Lys Leu Cys Pro Pro Gly Gly Ala Ser Phe
5 10 15
Leu Asp Ala Phe Asn Leu Ile Cys Pro Met
20 25

<210>: 10

<211>: 21

<212>: PRT

<213>: *Caenorhabditis elegans*

<228>: インスリン様ペプチド-2のC-ペプチドのアミノ酸配列

<400>: 10

Arg Arg Arg Arg Arg Ser Val Ser Glu Asn Tyr Asn Asp Gly Gly Gly
5 10 15
Ser Leu Leu Gly Arg
20

<210>: 11

<211>: 23

<212>: PRT

<213>: Caenorhabditis elegans

<214>: インスリン様ペプチド-2のA鎖のアミノ酸配列

<400>: 11

Thr Met Asn Met Cys Cys Glu Thr Gly Cys Glu Phe Thr Asp Ile Phe

5

10

15

Ala Ile Cys Asn Pro Phe Gly

20

<210>: 12

<211>: 20

<212>: DNA

<213>: Artificial Sequence

<400>: 12

ccaggtgggt caacattcac 20

<210>: 13

<211>: 20

<212>: DNA

<213>: Artificial Sequence

<400>: 13

tcattctgt gtctgatgag 20

<210>: 11

<211>: 20

<212>: DNA

<213>: Artificial Sequence

<400>: 14

cattagcaaa gaagatcttc 20

<210>: 15

<211>: 20

<212>: DNA

<213>: Artificial Sequence

<400>: 15

agatcttcaa cgttgcaacc 20

<210>: 16

<211>: 20

<212>: DNA

<213>: Artificial Sequence

<400>: 16

gaatatgtgc tgtgagacgg 20

<210>: 17

<211>: 21

<212>: DNA

<213>: Artificial Sequence

<400>: 17

ggatgtgaat taactgacat t 21

<210>: 18

<211>: 23

<212>: DNA

<:213>; Artificial Sequence
<:400>; 18
ttatccaaaa ggattgcaga ttg 23
<:210>; 19
<:211>; 21
<:212>; Artificial Sequence
<:400>; 19
aatgtcagtg aattcacatc c 21
<:210>; 20
<:211>; 22
<:212>; DNA
<:213>; Artificial Sequence
<:400>; 20
ggtttaatta cccaagtttg ag 22

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明のインスリン様ペプチド-1及びインスリン様ペプチド-2の高次構造を、ブタインスリン及びヒトリラキシナー2の高次構造と比較する、コンピューターモデリング図である。

【図1】

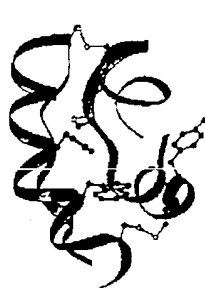


図1-A
インスリン様ペプチド-1

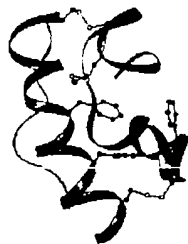


図1-B
インスリン様ペプチド-2

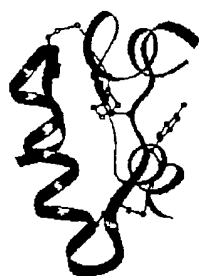


図1-C
ブタインスリン

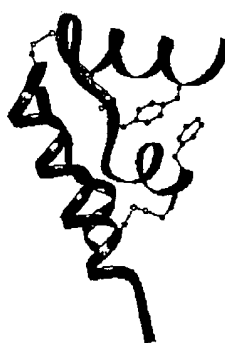


図1-D
ヒトリラキシナー2

フロントページの続き

(72)発明者 中嶋 暉躬

大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号

サントリー株式会社研究センター内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA02 CA04 CA09
CA11 DA06 EA04 GA11 GA19
HA01
4H045 AA10 BA17 BA18 CA50 DA37
EA20 EA50 FA74